

Incubation container for samples on object carriers, useful for carrying out polymerase chain reactions, comprising chamber formed by plate, cover and seal, containing reservoir to minimize evaporation

Publication number: DE19923584

Publication date: 2000-12-07

Inventor: BOSIO ANDREAS (DE); JANSEN UWE (DE)

Applicant: MEMOREC MEDICAL MOLECULAR RES (DE)

Classification:

- International: **B01L7/00; C12M1/00; B01L7/00; C12M1/00; (IPC1-7):
B01L7/00; C12M3/00; C12N15/00; C12Q1/68**

- European: B01L7/00; C12M1/00D

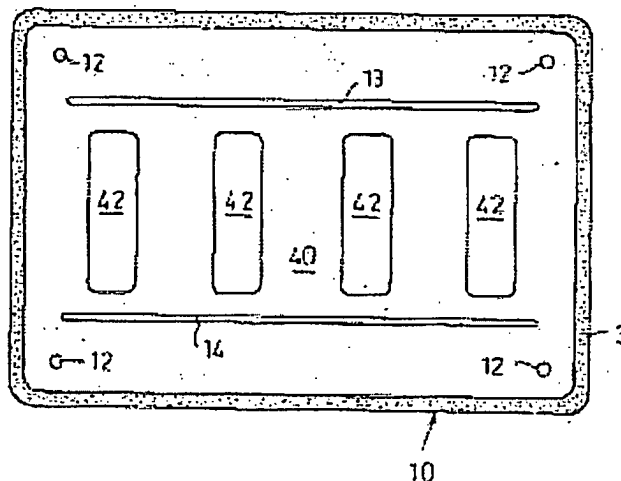
Application number: DE19991023584 19990521

Priority number(s): DE19991023584 19990521

Report a data error here

Abstract of DE19923584

An incubation container (1) comprising a carrier plate, a cover and a seal, such that the upper side of the plate, the cover and the seal together form an openable, enclosed chamber for incubating an object carrier, is new. The chamber contains at least one reservoir and at least two carrier elements for holding the object carrier above the upper side of the plate. Independent claims are also included for the following: (1) incubation apparatus comprising (1); and (2) an incubation method using (1).



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

(12) **Patentschrift**
(10) **DE 199 23 584 C 2**

(21) Aktenzeichen: 199 23 584.8-52
(22) Anmeldetag: 21. 5. 1999
(43) Offenlegungstag: 7. 12. 2000
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 24. 1. 2002

(51) Int. Cl.⁷:
B 01 L 7/00
C 12 M 3/00
C 12 Q 1/68
C 12 N 15/00
G 01 N 33/48
B 01 L 3/00

DE 199 23 584 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

- (73) Patentinhaber:
MEMOREC Medical Molecular Research Cologne
Stoffel GmbH, 50829 Köln, DE
- (74) Vertreter:
Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln
- (72) Erfinder:
Bosio, Andreas, Dr., 50674 Köln, DE; Janßen, Uwe,
Dr., 50825 Köln, DE

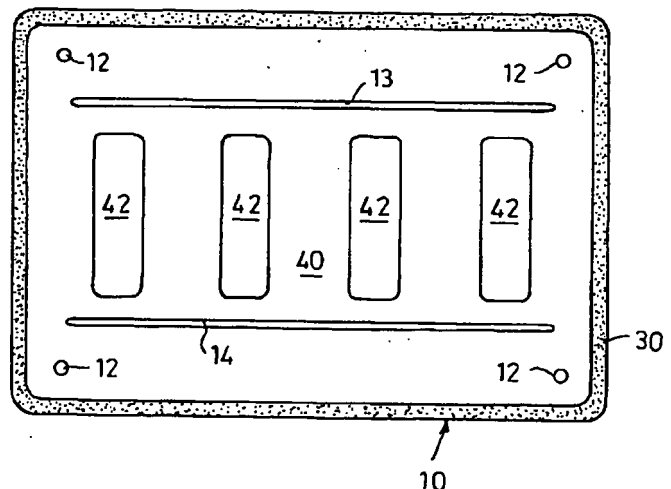
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE	39 05 465 A1
CH	6 79 282 A5
US	54 36 129
US	53 46 642
US	52 81 516
US	51 92 503
US	51 88 963
US	49 78 507
US	43 84 193
US	38 83 398
US	25 61 339
EP	08 63 213 A1
EP	06 62 345 A1
EP	05 24 808 A2
WO	93 19 207 A1
WO	91 07 486 A1

Sensors and Actuators, Vol.A62 (1997) S.672-675;

(54) Inkubationssystem

- (57) Inkubationssystem mit einem Inkubationsbehälter und mehreren Objektträgern, wobei der Inkubationsbehälter aus einer eine Oberseite (11) aufweisenden Trägerplatte (10), einem Deckel (20) und einer Dichtung (30) gebildet ist, wobei die Oberseite (11) der Trägerplatte (10), der Deckel (20) und die Dichtung (30) so angeordnet sind, dass sie eine geschlossene, öffnenbare Inkubationskammer (40) zur Aufnahme der Objektträger bilden und wobei sich innerhalb der Inkubationskammer (40) mindestens ein Reservoir (42) und mindestens zwei Stege (13, 14) zum beabstandeten Halten der Objektträger über der Oberseite (11) befinden, wobei die Inkubationskammer von der Größe her an die Objektträger angepasst ist, so dass sich die Objektträger auf Grund der Hebelwirkung der Stege (13, 14) leicht greifen lassen.



DE 199 23 584 C 2

[0001] Die Erfindung betrifft ein Inkubationssystem mit einem Inkubationsbehälter und mehreren Objektträgern.

[0002] Temperierte Reaktionen auf festen Oberflächen (Objektträger) sind in zunehmenden Maße Bestandteil gängiger Methoden der Molekularbiologie und Biochemie. Hierzu gehören u. a. Hybridisierungsreaktionen mit auf Objektträgern fixierten Proben, wie z. B. Gewebsschnitte, Zellpopulationen (in-situ-Hybridisierungen) aber auch Hybridisierungsreaktionen mit DNA-Chips (Microarrays). Diesen Reaktionen werden häufig in sehr kleinen Volumina (μ l-Maßstab) durchgeführt. Hierbei stellt sich oft das Problem, dass die Reaktionsbedingungen aufgrund des leichten Verdampfens kleinster Mengen an Lösungsmittel nicht über die vollständige Fläche konstant gehalten werden können.

[0003] Um eine gleichmäßige Verteilung der Reaktionslösung auf dem Objektträger zu erreichen und gleichzeitig die Luft/Lösungsmittel Grenzfläche zu verringern werden sog. Deckgläser vorwiegend aus Glas verwendet. Um bei sehr kleinen Volumina und/oder langen Reaktionszeiten ein Verdampfen des Lösungsmittels noch stärker zu unterdrücken werden diese Reaktionen im Stand der Technik in geschlossenen Behältnissen durchgeführt, in denen eine feuchte Atmosphäre gehalten wird.

[0004] Werden diese Behältnisse nur von unten auf die gewünschte Temperatur aufgeheizt, so bildet sich ein Temperaturgradient, der dazu führt, dass Flüssigkeit am Deckel kondensiert. Somit besteht wiederum die Möglichkeit, dass geringe Flüssigkeitsmengen der Reaktionslösung verdampfen. Die am Deckel kondensierte Flüssigkeit kann auf den Objektträger herabtropfen und somit die Reaktionsbedingungen drastisch verändern.

[0005] Dies kann bis zu einem gewissen Teil vermieden werden, indem das Behältnis von allen Seiten gleich stark beheizt wird. Verwendet werden hierzu z. B. Luft- oder Wasserbäder. Luftbäder haben den Nachteil, dass sie schon bei Temperaturen von über 40 bis 50°C nur unter großem Aufwand abdichten sind oder aber unter Hinnahme großer Energieverluste betrieben werden müssen. Ebenso stellt sich das Problem der Abdichtung für die verwendete Reaktionskammer, da Flüssigkeit in einem Luftbad, in dem die Luft zur homogenen Temperaturverteilung ständig umgewälzt wird, noch sehr viel schneller verdampft, als es ohne hin bei der erhöhten Temperatur der Fall ist.

[0006] Bei Verwendung von Wasserbädern und einem Untertauchen des Behältnisses entsteht das Problem, dass bei nicht hinreichender Abdichtung, Wasser in das Behältnis eindringen kann. Insgesamt ist die Handhabung erschwert, was gerade bei Analysen die mit radioaktiven Proben durchgeführt werden ein Ausschlusskriterium sein kann. Für Reaktionen, die eine Temperatur von über 100°C benötigen, würde ein Drucksystem wie z. B. ein Autoklav benötigt, welches in einem normal ausgestatteten molekularbiologischen oder biochemischen Labor nicht selbstverständlich ist.

[0007] Eine Möglichkeit diese Probleme zu beseitigen besteht im Stand der Technik darin, dass inerte Substanzen zu der Reaktionslösung zugemischt werden, die an der Peripherie des Deckglases einen dichten Film bilden und somit das Reaktionsvolumen vor Verdampfen schützen (z. B. "Self-Seal Reagent" der Firma MJ Research). Diese Systeme haben den Nachteil, dass zum einen die Deckgläser nach der Reaktion nur schwer wieder ablösbar sind und zum anderen die radioaktiv oder fluoreszenz-markierten Proben verstärkt am Rand des Deckglases präzipitieren und somit nicht mehr der Reaktion zur Verfügung stehen. Des weiteren werden Systeme angeboten, die aus einem Kunststoff-Dek-

kel bestehen, welcher direkt auf den Objektträger festgeklebt wird (z. B. "Frame-Seal" der Firma MJ Research oder "Hybriwell" der Firma SIGMA). Auch diese Systeme erschweren die Handhabung und sind ebenfalls z. T. nur schwer wieder zu entfernen. Für Reaktionsvolumen kleiner 15 μ l ist keines der genannten Systeme zu benutzen.

[0008] Aus der US 5 346 672 ist es bekannt auf einem Objektträger einen Deckel vorzusehen, so dass zwischen dem Deckel und dem Objektträger eine Kammer ausgebildet ist. In der Kammer befindet sich ein Probenbereich, der durch den Rand des Deckels begrenzt ist. Der Rand des Deckels liegt auf dem Objektträger auf und wird durch eine Druckplatte und eine entsprechende Anordnung von Schrauben und Federn auf den Objektträger gedrückt. An der Unterseite des Objektträgers liegt eine Heizplatte an, die die Unterseite des Objektträgers berührt.

[0009] Aus der WO 91/07486 A1 ist ein Inkubationsbehälter bekannt, in dem getrocknete Proben untersucht werden. Die in einer Matrix angeordneten getrockneten Proben werden zur Untersuchung rehydriert. Hierzu weist die beschriebene Vorrichtung einen Flüssigkeitsaufnahmebereich auf, um dem Inkubationsbehälter Flüssigkeit zuzuführen. Die Flüssigkeitszufuhr erfolgt durch eine Flüssigkeitseinfüllöffnung, so dass ein Deckel des Inkubationsbehälters die Inkubationskammer nicht vollständig und dicht verschließt.

[0010] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung eines Inkubationssystems, der in Verbindung mit Heizblöcken, wie sie vorwiegend zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet werden, die genannten Nachteile vermeidet. Insbesondere soll das erfindungsgemäße Inkubationssystem eine leicht zugängliche temperiert Reaktionsführung auf den Objektträgern ermöglichen.

[0011] Die Lösung der Aufgabe erfolgt erfindungsgemäß durch ein Inkubationssystem mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1.

[0012] Das erfindungsgemäße Inkubationssystem weist einen Inkubationsbehälter und mehrere Objektträger auf. Der Inkubationsbehälter ist hierbei aus einer Oberseite aufweisenden Trägerplatte, einem Deckel und einer Dichtung gebildet, so dass eine geschlossene öffenbare Inkubationskammer zur Aufnahme der Objektträger ausgebildet ist. Innerhalb der Inkubationskammer ist ein Reservoir vorgesehen. Ferner sind erfindungsgemäß mindestens zwei Stege zum beabstandeten Halten der Objektträger über der Oberseite der Trägerplatte vorgesehen. Die Inkubationskammer ist hierzu von der Größe her an die Objektträger derart angepasst, dass sich die Objektträger auf Grund der Hebelwirkung der Stege leicht greifen lassen.

[0013] Durch die Stege ist sichergestellt, dass die Objektträger nicht mit der Kammerflüssigkeit in Kontakt kommen. Weiterhin lassen sich aufgrund der Hebelwirkung der Stege die Objektträger durch leichtes Herabdrücken des einen Endes am anderen Ende leicht greifen, was beim Hereinlegen und Herausnehmen der Objektträger eine große Hilfe ist.

[0014] Das Inkubationssystem umfaßt somit eine Trägerplatte, einen Deckel und eine Dichtung. Die Dichtung befindet sich so zwischen der Trägerplatte und dem Deckel, dass ein Innenvolumen besteht. Vorzugsweise dient ein Führungskanal dazu, das Abdichtungsgummi zu fixieren. Auf der Trägerplatte befinden sich mindestens ein Reservoir zur Aufnahme von Flüssigkeit und mindestens zwei Trägerelemente, auf denen die Objektträger in der Inkubationskammer gelagert werden. Das Reservoir dient zur Aufnahme einer Flüssigkeit, insbesondere Wasser, die durch Verdampfen eine hohe Luftfeuchtigkeit in der Inkubationskammer gewährleistet, so dass die Verdampfung von Flüssigkeit aus den Objektträgern vermindert wird. Zwar können die Reser-

voire auch als Becher oder Wannen auf der Oberseite der Trägerplatte ausgebildet sein, es ist jedoch bevorzugt, dass sie in die Oberseite eingelassen sind, um eine gute Beheizbarkeit zu gewährleisten und beim Einlegen der Objektträger nicht zu behindern. Die Trägerelemente dienen zum Halten der Objektträger in der Inkubationskammer. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die zwei Trägerelemente parallel angeordnet und in Form von Stegen ausgebildet.

[0015] Es ist weiterhin bevorzugt, dass der Deckel und die Trägerplatte ein Zapfen und ein Loch zum Ausrichten des Deckels und der Trägerplatte aufweisen. Dabei befindet sich der Zapfen bevorzugt am Deckel, da hierdurch die Trägerplatte eben gestaltet werden kann.

[0016] Zur Verbesserung der Wärmeleitung bestehen die Trägerplatte und bevorzugt auch der Deckel aus Metall. Geeignete Metalle sind insbesondere Stahl, Kupfer, Aluminium, wobei harteloxiertes Aluminium bevorzugt ist.

[0017] Die Inkubationskammer ist von der Größe her bevorzugt an die Größe von Mikroskopie-Objektträgern angepasst. Die Inkubationskammer eignet sich bevorzugt zur Aufnahme von zwei oder vier Mikroskopie-Objektträgern. Eine geeignete Innengröße der Inkubationskammer beträgt zumindest 107×77 mm, so dass bis zu vier Objektträgern eingelegt werden können, ohne sich gegenseitig oder die umlaufende Dichtung zu berühren.

[0018] Bevorzugt weist der gesamte Inkubationsbehälter eine Größe auf, die an einen üblichen PCR-Heizblock angepasst ist. Die Trägerplatte hat daher eine Grundfläche von etwa 128×86 mm, der Deckel hat bevorzugt eine gleiche oder kleinere Grundfläche als die Trägerplatte.

[0019] Die Temperierung des Inkubationsbehälters erfolgt bevorzugt durch Einsatz eines Heizblockes. Zur Fixierung des Heizblockes und zur Verbesserung der Wärmeleitung weist die der Oberseite der Trägerplatte gegenüberliegende Seite daher bevorzugt Vorsprünge zum Eingreifen in Aufnahmeöffnungen eines Heizblockes auf. Die entsprechenden Vorsprünge dienen ebenfalls als Trägerfüße für die Trägerplatte. Sie laufen bevorzugt konisch zu.

[0020] Die Kanten der Grundfläche der Trägerplatte sind vorzugsweise abgerundet um einer Beschädigung des Heizblockes, in den die Inkubationskammer eingelegt wird, zu vermeiden.

[0021] Zur Vermeidung von Kondensation am Deckel des Inkubationsbehälters ist es bevorzugt, dass der Heizblock ebenfalls einen Deckel aufweist, wobei dieser in einer bevorzugten Ausführungsform mit einer im Heizblock getrennt steuerbaren Deckelheizung versehen ist. Dadurch kann durch eine höhere Temperatur am Heizblockdeckel gegenüber dem restlichen Heizblock eine Kondensation von Flüssigkeit am Deckel des Inkubationsbehälters vermieden werden.

[0022] Aufgrund der Außenmaße des erfindungsgemäßen Inkubationssystems kann dieses in allen gängigen Thermocyclern bzw. PCR-Geräten eingesetzt werden.

[0023] Bei PCR-Geräten kann zumeist sowohl die Block- als auch die Deckeltemperatur unabhängig voneinander angesteuert werden. Durch Einstellen einer leicht höheren Temperatur des Deckels wird die Bildung von Kondenswasser am Deckel vermieden. Es können ohne weiteres Temperaturen von über 100°C erreicht werden. Dadurch, dass der Deckel bei den meisten PCR-Geräten auf die jeweiligen Reaktionsgefäße aufgedrückt werden kann, ist es möglich die Reaktionskammer durch eine einfache Gummi-Dichtung ohne weitere Versiegelung abzudichten.

[0024] Da mittlerweile in fast jedem Labor im Bereich Molekularbiologie, Biochemie, Diagnostik Thermocycler unterschiedlicher Firmen für die PCR zur Verfügung steht, ist es für den Anwender wesentlich günstiger und besser die

erfindungsgemäße Inkubationskammer zu verwenden als auf die bestehenden aufwendigeren Systeme zurückzugreifen. Gerade im Bereich kleinster Volumina ($10 \mu\text{l}$) wässriger Lösungen zeigt die erfindungsgemäße Inkubationskammer geringe Verdampfungsraten.

[0025] Da wie schon erwähnt z. T. mit sehr kleinen Volumen gearbeitet wird, muß sichergestellt sein, dass möglichst schnell nach Auftragen der Reaktionslösung der Objektträger in eine wie auch immer geartete geschlossene und feuchte Kammer gestellt wird. Oftmals stehen allerdings die PCR-Geräte in einem Zentrallabor, auf das mehrere Abteilung Zugriff haben. In solchen Fällen weist die erfindungsgemäße Inkubationskammer den Vorteil auf, dass die Bestückung der Kammer nicht zwangsläufig im gleichen Raum geschehen muß, in dem auch der Thermoblock steht.

[0026] Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Inkubationssystems läßt sich ein Verfahren zur Inkubation von Substanzen, bei dem die Substanzen auf Objektträgern aufgebracht werden und einem erfindungsgemäßen Inkubationsbehälter inkubiert werden, verwirklichen.

[0027] Fig. 1 zeigt die Trägerplatte 10 aus Sicht der Oberseite 11. Die Dichtung 30 umschließt die Trägerplatte an der Außenseite ab, so dass eine Inkubationskammer 40 gebildet wird. Die Trägerelemente 13 und 14 erlauben das Auflegen eines Objektträgers. Die Reservoirs 42 dienen zur Aufnahme von Flüssigkeit.

[0028] Fig. 2 zeigt eine Seitenansicht. Die Zapfen 21 fassen beim Auflegen des Deckels 20 in die Löcher 12 und dienen zur Fixierung des Deckels 20 auf der Trägerplatte 10. Die Vorsprünge 15 dienen als Standfüße für den Inkubationsbehälter und zum Einsetzen in den Heizblock.

Patentansprüche

1. Inkubationssystem mit einem Inkubationsbehälter und mehreren Objektträgern, wobei der Inkubationsbehälter aus einer Oberseite (11) aufweisenden Trägerplatte (10), einem Deckel (20) und einer Dichtung (30) gebildet ist, wobei die Oberseite (11) der Trägerplatte (10), der Deckel (20) und die Dichtung (30) so angeordnet sind, dass sie eine geschlossene, offene Inkubationskammer (40) zur Aufnahme der Objektträger bilden und wobei sich innerhalb der Inkubationskammer (40) mindestens ein Reservoir (42) und mindestens zwei Stege (13, 14) zum beabstandeten Halten der Objektträger über der Oberseite (11) befinden, wobei die Inkubationskammer von der Größe her an die Objektträger angepasst ist, so dass sich die Objektträger auf Grund der Hebelwirkung der Stege (13, 14) leicht greifen lassen.
2. Inkubationssystem nach Anspruch 1, wobei der Deckel (20) und die Trägerplatte (10) mindestens einen Zapfen (21) und mindestens ein Loch (12) zum Ausrichten des Deckels (20) und der Trägerplatte (10) aufweisen.
3. Inkubationssystem nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Reservoir (42) in die Oberseite (11) der Trägerplatte (10) eingelassen ist.
4. Inkubationssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägerplatte (10) und der Deckel (20) aus Metall bestehen.
5. Inkubationssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine der Oberseite (11) der Trägerplatte (10) gegenüberliegende Seite Vorsprünge (15) zum Eingreifen in Aufnahmeöffnungen (101) eines Heizblocks (100) aufweist.
6. Verwendung des Inkubationssystems nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Durchführung von Polymer-

rase-Kettenreaktionen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

